Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Instituts für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H. Sachs)

# Ueber den Einfluß der Konzentration auf die Komplementbindung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

**Edith Sussmanowitz**
von Bayern

Jena
Gustav Fischer
1933

Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Instituts für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H. Sachs)

# Ueber den Einfluß der Konzentration auf die Komplementbindung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Medizinischen Fakultät

der

Universität Basel

vorgelegt von

**Edith Sussmanowitz**
von Bayern

Jena
Gustav Fischer
1933

Genehmigt von der Medizinischen Fakultät der Universität Basel auf Antrag von Herrn Prof. Robert Doerr.

---

Tag der Promotion: 9. Jan. 1934

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 80. 1933. S. 95.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

*Nachdruck verboten.*

[Aus der wissenschaftlichen Abteilung des Instituts für experimentelle Krebsforschung in Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. H. Sachs).]

# Ueber den Einfluß der Konzentration auf die Komplementbindung.

Von **Edith Sussmanowitz.**

(Eingegangen bei der Redaktion am 15. Mai 1933.)

Wenngleich schon zahlreiche Angaben des älteren Schrifttums darauf hinweisen, daß es bei serologischen Reaktionen nicht allein auf die absoluten Mengen, sondern nicht selten auch wesentlich auf die Konzentrationsbedingungen ankommt, so ist diesem Umstand bei der Komplementbindung im allgemeinen verhältnismäßig wenig Beachtung geschenkt worden. Man hat sich entsprechend dem bei der Wassermannschen Reaktion geübten Vorgange vielfach daran gewöhnt, bei der Komplementbindung jede der fünf beteiligten Komponenten im gleichen Volumen an der Reaktion teilnehmen zu lassen. Ein derartiges Verfahren hat zur Folge, daß die eigentliche Komplementbindungsphase bereits in verhältnismäßig großem Volumen vor sich geht. Verschiedene Erfahrungen schienen aber darauf hinzuweisen, daß der Komplementbindungseffekt mit der Konzentration, d. h. also mit der Volumverminderung eine Verstärkung erfahren könnte[1]). Tatsächlich entspricht eine derartige Volumverminderung auch früheren Formen der Anwendung der Komplementbindung

1) Vgl. hierzu G. Satta und A. Donati, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 15, 1912, S. 584; R. accad. med. Torino, 1909; Wien. klin. Wochenschr., 1911, No. 29; siehe jedoch: J. Bordet et F. P. Gay, Ann. Inst. Pasteur, T. 20, und 22, 1906 und 1908.

zu diagnostischen Zwecken, so bei der biologischen Eiweißdifferenzierung wie auch beim Nachweis von Meningokokken- und anderen Antikörperarten.

Unter diesen Bedingungen erschienen vergleichende Versuche darüber nicht ohne Interesse, inwieweit die Stärke der Komplementbindung von den Volumverhältnissen bzw. von der Konzentration im Komplementbindungsstadium abhängt. Von diesem Gesichtspunkte aus sind die folgenden Untersuchungen ausgeführt worden.

Methodologisch wurde mit sogenannten halben Dosen gearbeitet; d. h. nach Zusatz des hämolytischen Systems bestand ein Volumen von 2,5 ccm. In der Komplementbindungsphase wurden aber die 3 Komponenten (Antigen—Antiserum—Komplement) im Volumen von je 0,1 ccm gemischt. In den Versuchsteilen mit schwächerer Konzentration erfolgte dann ein geeigneter Zusatz von physiologischer Kochsalzlösung, maximal 1,2 ccm. In den Versuchsteilen mit stärkerer Konzentration wurde die jeweils zu 1,5 ccm Volumen fehlende Menge von physiologischer Kochsalzlösung nach der Bindungszeit gleichzeitig mit dem hämolytischen System zugefügt. Als hämolytisches System diente ein gleichteiliges Gemisch von je 0,5 ccm Hammelblutaufschwemmung und 0,5 ccm Ambozeptorverdünnung.

Die eingetretene Hämolyse wurde wie üblich abgeschätzt und wie folgt notiert:

| | |
|---|---|
| k = komplette Hämolyse | w = wenig Hämolyse |
| fk = fast komplette Hämolyse | Sp = Spur ,, |
| st = starke Hämolyse | Spch = Spürchen Hämolyse |
| m = mäßige ,, | 0 = keine Hämolyse |

Der größte Teil der Versuche erstreckte sich auf die Prüfung von Serum-Antisera. Die Antisera wurden durch Vorbehandlung von Kaninchen mit Schweineserum oder Rinderserum gewonnen. Hierbei ergaben sich sehr deutliche Unterschiede je nach der Konzentration in der Bindungsphase. Ein Versuchsbeispiel dieser Art sei im folgenden angeführt.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von Schweineserum wurden mit je 0,1 ccm verdünntem Schweineserum-Antiserum unter Zusatz von je 0,1 ccm

a) 2fach verdünnten Meerschweinchenserums,
b) 2fach ,, ,, und 1,2 ccm physiol. Kochsalzlösung

eine Stunde im Brutschrank digeriert.

Sodann erfolgte Zusatz von je 1,0 ccm einer gleichteiligen Mischung von Hammelblutaufschwemmung und Ambozeptorverdünnung, zur Reihe a) außerdem Zusatz von 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Die eingetretene Hämolyse ist nach 20 Minuten ($\alpha$), 50 Minuten ($\beta$), 5 Stunden ($\gamma$) sowie am nächsten Tag ($\delta$) notiert. Das Ergebnis zeigt Tabelle I.

Tabelle I.

| Verdünnungen von Schweineserum | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Schweineserum und Schweineserum-Antiserum | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | a ohne Zusatz von Kochsalzlösung (stark konzentriert) | | | | b mit Zusatz von Kochsalzlösung (schwach konzentr.) | | | |
| | α 20′ | β 50′ | γ 5 Std. | δ 24 Std. | α 20′ | β 50′ | γ 5 Std. | δ 24 Std. |
| 1:200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch | st | k |
| 1:400 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch | st | k |
| 1:800 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch | st | k |
| 1:1600 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | m | k |
| 1:3200 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Sp | fk | k |
| 1:6400 | 0 | 0 | 0 | Sp | st | w | fk | k |
| 1:12 800 | 0 | 0 | w | st | fk | k | k | k |
| 1:25 600 | Sp | m | k | k | k | k | k | k |
| ∞ | k | k | k | k | k | k | k | k |

Wie die Tabelle zeigt, ist unter den dem Vorgang bei der Wassermannschen Reaktion angepaßten Bedingungen (b) eine Komplementbindung bei der letzten Ablesung überhaupt nicht mehr wahrzunehmen. Im Gegensatz dazu ist in Reihe a, in der Antigen, Antikörper und Komplement in starker Konzentration aufeinander einwirkten, unter sonst gleichen Verhältnissen eine starke Komplementbindung eingetreten. Es ergibt sich also ein sehr weitgehender Einfluß der Konzentration auf die Komplementbindung. Bemerkenswert ist, daß bei kurzfristiger Ablesung auch in Reihe b bei schwacher Konzentration eine, wenn auch geringe, Komplementbindung eingetreten ist. Man darf daraus schließen, daß der Komplementbindungseffekt bei schwacher Konzentration zugleich eine geringere Stabilität aufweist als bei starker Konzentration.

Dementsprechend waren bei frühzeitiger Ablseung die Unterschiede zwischen schwacher und starker Konzentration besonders deutlich, wenn die Bindungszeit hinreichend herabgesetzt wurde, wie es folgendes Versuchsbeispiel zeigt.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von Schweineserum wurden mit je 0,1 ccm 6fach verdünnten Schweineserum-Antiserums unter Zusatz von je

a) 0,1 ccm 3fach verdünnten Meerschweinchenserums,

b) 0,1 ccm 3fach „ „ und 1,2 ccm physiol. Kochsalzlösung

digeriert. Die Bindungszeit im Brutschrank war

in den Reihen I 10 Minuten,
in den Reihen II eine Stunde.

Nach Zusatz des hämolytischen Systems und Beschickung der Reihen a mit 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung ergab sich nach 20 Minuten (α) sowie nach einer Stunde (β) die aus Tabelle II ersichtliche Hämolyse.

Tabelle II.

| Verdünnungen von Schweineserum | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Schweineserum und Schweineserum-Antiserum | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I 10 Minuten lang | | | | II 1 Stunde lang | | | |
| | a stark konzentriert | | b schwach konzentriert | | a stark konzentriert | | b schwach konzentriert | |
| | α | β | α | β | α | β | α | β |
| 1:200 | 0 | k | k | k | 0 | 0 | 0 | k |
| 1:400 | 0 | m | fk | k | 0 | 0 | 0 | m |
| 1:800 | 0 | m | st | k | 0 | 0 | 0 | m |
| 1:1600 | 0 | st | fk | k | 0 | 0 | 0 | m |
| 1:3200 | 0 | k | k | k | 0 | 0 | 0 | k |
| 1:6400 | Sp | k | k | k | 0 | 0 | 0 | k |
| 1:12 800 | m | k | k | k | 0 | st | k | k |
| 1:25 600 | m | k | k | k | 0 | k | k | k |
| ∞ | k | k | k | k | k | k | k | k |

Die Tabelle zeigt, daß nach 10 Minuten langer Bindungszeit (Teil I) ein sehr starker Unterschied zwischen starker und schwacher Konzentration wahrzunehmen ist, wenn auch in diesem Falle die bei starker Konzentration eingetretene Bindung verhältnismäßig labil erscheint. Daß aber auch bei längerer Bindungszeit in schwacher Konzentration die Stabilität des Bindungseffekts nicht sehr wesentlich steigt, zeigt in Uebereinstimmung mit Tabelle I Teil II des Versuchs.

Aus den in dieser Stärke nicht erwarteten Unterschieden ergab sich zugleich die Frage, ob nicht etwa bei starker Konzentration unspezifische Reaktionen interferieren. Das folgende Versuchsbeispiel, das ein Rinderserum-Antiserum betrifft, zeigt jedoch, daß auch bei starker Konzentration die Spezifität absolut gewahrt erscheint.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von
a) 40fach verdünntem Rinderserum,
b) konzentriertem Menschenserum,

c) konzentriertem Schweineserum,
d) „ Pferdeserum

wurden mit je 0,1 ccm 10fach verdünnten Rinderserum-Antiserums unter Zusatz von je 0,1 ccm

I. 4fach verdünnten Meerschweinchenserums,
II. 4fach „ „ + 1,2 ccm physiolog. Kochsalzlösung

eine Stunde im Brutschrank digeriert.

Nach Zusatz des hämolytischen Systems und von je 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung zum Versuchsteil II ergab sich die aus Tabelle III ersichtliche Hämolyse.

Tabelle III.

| Serumverdünnungen | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Rinderserum-Antiserum und Blutserum | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I stark konzentriert | | | | II schwach konzentriert | | | |
| | a 40f. verd. Rinderserum | b Menschenserum | c Schweineserum | d Pferdeserum | a 40f. verd. Rinderserum | b Menschenserum | c Schweineserum | d Pferdeserum |
| 1:10 | 0 | k | k | k | 0 | k | k | k |
| 1:20 | 0 | k | k | k | 0 | k | k | k |
| 1:40 | 0 | k | k | k | 0 | k | k | k |
| 1:80 | 0 | k | k | k | Sp | k | k | k |
| 1:160 | 0 | k | k | k | fk | k | k | k |
| 1:320 | 0 | k | k | k | k | k | k | k |
| 1:640 | w | k | k | k | k | k | k | k |
| 1:1280 | st | k | k | k | k | k | k | k |
| 1:2560 | k | k | k | k | k | k | k | k |

Der Versuch zeigt, daß auch bei starker Konzentration in der Komplementbindungsphase eine Spezifität der Wirkung besteht. Sie ist um so bemerkenswerter, als das homologe Rinderserum in 40fach stärkerer Verdünnung zur Benutzung gelangte als die übrigen heterologen Blutsera. Es ergibt sich daraus, daß das Arbeiten in starker Konzentration in der Komplementbindungsphase augenscheinlich eine wesentliche Steigerung der Komplementbindungsstärke bei der biologischen Eiweißdifferenzierung bedingen kann.

Die Unterschiede traten in gleicher Weise ein, wenn anstatt mit absteigenden Antigenmengen mit absteigenden Antiserum-

dosen gearbeitet wurde. Auch hierfür sei im folgenden ein Versuchsbeispiel wiedergegeben.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von Rinderserum-Antiserum wurden mit je 0,1 ccm

a) 100fach verdünnten Rinderserums,
b) 500fach „ „
c) 2500fach „ „

unter Zusatz von je 0,1 ccm

I. 3fach verdünnten Meerscheinchenserums,
II. 3fach „ „ + 1,2 ccm physiolog. Kochsalzlösung

eine Stunde im Brutschrank digeriert. Sodann erfolgte Zusatz des hämolytischen Systems und von je 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung zu den Reihen II. Die eingetretene Hämolyse zeigt Tabelle IV.

Tabelle IV.

| Verdünnungen des Rinderserum-Antiserums | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Rinderserum-Antiserum und Rinderserum | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | I stark konzentriert | | | II schwach konzentriert | | |
| | a 100fach verdünnt | b 500fach verdünnt | c 2500fach verdünnt | a 100fach verdünnt | b 500fach verdünnt | c 2500fach verdünnt |
| 1:2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:8 | 0 | 0 | 0 | 0 | w | k |
| 1:16 | 0 | 0 | 0 | w | k | k |
| 1:32 | w | w | k | k | k | k |
| 1:64 | k | k | k | k | k | k |

Auch hier zeigt sich in entsprechender Weise, daß unter Verwendung starker Konzentration wesentlich geringere Antiserummengen ausreichen, um zur Komplementbindung zu führen. Der Versuch entspricht daher den übrigen Erfahrungen.

Weiterhin wurde geprüft, wie sich bei engeren Variationen der Konzentration in der Bindungsphase die Bedingungen gestalten. Zu diesem Zwecke wurde folgendermaßen verfahren.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von Rinderserum wurden mit je 0,1 ccm 8fach verdünnten Rinderserum-Antiserums unter Zusatz von je 0,1 ccm

a) 3fach verdünntem Meerschweinchenserum,
b) 3fach „ „ + 0,3 ccm physiolog. Kochsalzlösung

c) 3fach verdünntem Meerschweinchenserum + 0,6 ccm physiolog. Kochsalzlösung
d) 3fach „ „ + 1,2 ccm physiolog. Kochsalzlösung

15 Minuten im Brutschrank digeriert. Sodann erfolgte Zusatz des hämolytischen Systems und Zufügen

zu Reihe a) von 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung,
zu Reihe b) „ 0,9 ccm „ „
zu Reihe c) „ 0,6 ccm „ „

Die eingetretene Hämolyse ist aus Tabelle V ersichtlich.

Tabelle V.

| Verdünnungen des Rinderserums | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Rinderserum-Antiserum und Rinderserum im Volumen von | | | |
|---|---|---|---|---|
| | a 0,3 ccm | b 0,6 ccm | c 0,9 ccm | d 1,5 ccm |
| 1:50 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:200 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:400 | 0 | 0 | 0 | sp |
| 1:800 | 0 | 0 | w | st |
| 1:1600 | 0 | 0 | w | k |
| 1:3200 | 0 | 0 | st | k |
| 1:6400 | 0 | m | fk | k |
| 1:12 800 | w | k | k | k |
| 1:25 600 | k | k | k | k |

Wie die Tabelle zeigt, nimmt die Komplementbindung mit Sinken der Konzentration fortschreitend ab. Es handelt sich hier also augenscheinlich um einen gesetzmäßigen, quantitativ bedingten Vorgang. Bemerkenswert ist der erhebliche Komplementbindungseffekt bei starker Konzentration trotz der geringen Bindungszeit von 15 Minuten. Es dürfte sich hieraus ergeben, daß der Steigerung der Konzentration in der Komplementbindungsphase neben der Erhöhung der Empfindlichkeit zugleich der Vorteil zukommt, die Bindungszeit nicht unwesentlich abkürzen zu können.

Es ist verständlich, daß die von der Konzentration abhängigen Unterschiede um so deutlicher zum Ausdruck kommen, je geringere Antiserummengen benutzt werden. Ein Versuchsbeispiel, das diese Bedingungen zeigt, sei im folgenden angeführt.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von Rinderserum wurden in den Reihen a) unter Zusatz von je 0,1 ccm 4fach verdünnten Rinderserum-Antiserums,

in den Reihen b) unter Zusatz von je 0,1 ccm 8fach verdünnten Rinderserum-Antiserums

mit je 0,1 ccm 3fach verdünnten Meerschweinchenserums digeriert.

In den Reihen I blieben die Gemische stark konzentriert,

in den Reihen II erfolgte Zusatz von je 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung.

Nach einstündigem Brutschrankaufenthalt wurden zu den Reihen I) je 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt, zu allen Reihen außerdem je 1 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblut und Ambozeptorverdünnung.

Die nach 20 Minuten langem (α) und nach 2stündigem (β) Brutschrankaufenthalt eingetretene Hämolyse ist aus Tabelle VI ersichtlich.

Tabelle VI.

| Verdünnungen des Rinderserums | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Rinderserum-Antiserum und Rinderserum | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | I stark konzentriert | | | | II schwach konzentriert | | | |
| | a 4fach verd. Antiserum | | b 8fach verd. Antiserum | | a 4fach verd. Antiserum | | b 8fach verd. Antiserum | |
| | α | β | α | β | α | β | α | β |
| 1:20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch | 0 | w |
| 1:40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Sp |
| 1:80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch |
| 1:160 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch |
| 1:320 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch |
| 1:640 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | m |
| 1:1280 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Spch | 0 | st |
| 1:2560 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | w | Spch | k |
| 1:5120 | 0 | 0 | 0 | 0 | m | k | st | k |
| ∞ | k | k | k | k | k | k | k | k |

Die Tabelle weist sehr deutliche Unterschiede je nach der Konzentration der Reaktionsgemische in der Komplementbindungsphase auf. Sie zeigt zugleich, daß die Differenzen mit der Verringerung der Antiserummenge außerordentlich groß werden. Charakteristisch ist auch in diesem Versuchsbeispiel die verhältnismäßig geringe Stabilität der Komplementbindung nach dem Digerieren der Gemische in schwacher Konzentration, wie sie sich aus einem Vergleich der Reihen α und β ergibt.

Von den Bedingungen, die geeignet sind, den Komplementbindungseffekt zu verstärken, hat sich in letzter Zeit durch Unter-

suchungen Neters[1]) insbesondere der Einfluß eines verminderten Kochsalzgehaltes während der Komplementbindungsphase als stark wirksam erwiesen. Es erschien daher nicht ohne Interesse, die beiden begünstigenden Faktoren, Verminderung des Salzgehaltes und starke Konzentration, miteinander zu kombinieren. Daß sich hieraus in der Tat eine weitere Verstärkung der Komplementbindung ergibt, zeigt das folgende Versuchsbeispiel.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen von Rinderserum wurden unter Zusatz von je 0,1 ccm 8fach verdünnten Rinderserum-Antiserums mit je 0,1 ccm 3fach verdünnten Meerschweinchenserums

I. in 0,9proz. Kochsalzlösung,
II. in 0,6 „ Kochsalzlösung

digeriert.

Zu den Reihen a) wurden je 1,2 ccm entsprechender Kochsalzlösung zugefügt, während

in den Reihen b) die Digestion in starker Konzentration erfolgte.

Nach 15 Minuten langer Bindungszeit wurden in den Reihen b) 1,2 ccm entsprechender Kochsalzlösung zugefügt, zu allen Röhrchen je 1,0 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Ambozeptorverdünnung, die für Teil I des Versuchs in 0,9proz. Kochsalzlösung, für Teil II des Versuchs in 1,8proz. Kochsalzlösung bereitet war.

Die eingetretene Hämolyse zeigt Tabelle VII.

Tabelle VII.

| Verdünnungen des Rinderserums | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Rinderserum-Antiserum und Rinderserum | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I in 0,9 % NaCl | | II in 0,6 % NaCl | |
| | a schwach konzentriert | b stark konzentriert | a schwach konzentriert | b stark konzentriert |
| 1:200 | m | 0 | 0 | 0 |
| 1:400 | m | 0 | 0 | 0 |
| 1:800 | k | 0 | 0 | 0 |
| 1:1600 | k | 0 | m | 0 |
| 1:3200 | k | 0 | st | 0 |
| 1:6400 | k | 0 | k | 0 |
| 1:12 800 | k | st | k | 0 |
| 1:25 600 | k | k | k | 0 |
| 1:51 200 | k | k | k | st |
| 1:102 400 | k | k | k | k |

1) E. Neter, Zeitschr. f. Immunitätsf., Bd. 72, 1931, S. 136.

Aus Teil II der Tabelle ergibt sich, daß durch Herabsetzung der Kochsalzkonzentration in der Bindungsphase das Optimum keineswegs erreicht ist. Ein Vergleich der Reihen IIa und IIb zeigt deutlich die erhebliche Verstärkung, zu der auch bei herabgesetzter Kochsalzkonzentration die Volumenverminderung führt. Ein Vergleich der einzelnen Reihen des Versuchs zeigt daher, wie durch die beiden Faktoren, Herabsetzung des Kochsalzgehaltes und Erhöhung der Konzentration, eine Summation der Wirkung erreicht wird, so daß sich unter diesen Bedingungen trotz der kurzen und daher verhältnismäßig ungünstigen Bindungszeit maximale Wirkungen ergeben.

Die Verstärkung der Komplementbindung durch Konzentrationssteigerung war nicht auf Serum-Antisera beschränkt. Sie kam vielmehr auch, wenn auch zuweilen nur in geringem Grade, bei Verwendung von antibakteriellen Immunsera zum Ausdruck. Ein Versuchsbeispiel soll das demonstrieren.

Je 0,1 ccm steigender Verdünnungen eines Metschnikow-Immunserums wurden unter Zusatz von je 0,1 ccm 3fach verdünnten Meerschweinchenserums mit je 0,1 ccm

a) 20fach verdünnter Suspension von abgetöteten Metschnikowvibrionen,
b) 40fach „ „ von abgetöteten Metschnikowvibrionen

eine Stunde im Brutschrank gehalten. Im Versuchsteil I wurden je 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt, während Versuchsteil II zunächst ohne Zusatz blieb. Nach der Bindungszeit erfolgte Zusatz von je 1,2 ccm Kochsalzlösung im Versuchsteil II und zu allen Röhrchen Zusatz von je 1 ccm einer gleichteiligen Mischung von Hammelblut und Ambozeptor.

Die eingetretene Hämolyse zeigt Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

| Verdünnungen des Metschnikow-Immunserums | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Metschnikow-Suspension und Metschnikow-Immunserum | | | |
|---|---|---|---|---|
| | I schwach konzentriert | | II stark konzentriert | |
| | a 1/20 Suspens. | b 1/40 Suspens. | a 1/20 Suspens. | b 1/40 Suspens. |
| 1:4 | m | k | 0 | m |
| 1:8 | m | k | 0 | m |
| 1:16 | m | k | 0 | w |
| 1:32 | fk | k | 0 | m |
| 1:64 | k | k | fk | fk |
| 1:128 | k | k | k | k |

Wenn auch die Unterschiede nicht so groß sind, wie in den bereits mitgeteilten Versuchen mit Serum-Antiserum, so treten sie doch auch hier deutlich hervor. Es zeigt sich, daß eine vollständige Komplementbindung unter den gegebenen Bedingungen überhaupt nur bei starker Konzentration erzielbar war, und daß jedenfalls mit der Verminderung des Volumens in der Bindungsphase die Komplementbindung verstärkt wird. Die einzelnen Versuche ließen zwar quantitative Variationen erkennen, ergaben aber doch übereinstimmend die hier behandelte Erscheinung.

Es eröffnete sich daher die Frage, ob die Verstärkung durch Volumenverminderung sich auch bei diagnostischen Reaktionen zum Nachweis antibakterieller Antikörper geltend macht. Ich prüfte in dieser Hinsicht die Serodiagnostik der Tuberkulose unter Benutzung des von Witebsky, Klingenstein und Kuhn angegebenen Tuberkuloseantigens[1]). Die Versuchsbedingungen mußten natürlich entsprechend angepaßt werden. Wie das folgende Versuchsbeispiel zeigt, ergab sich dann jedenfalls eine Verstärkung der Reaktionsfähigkeit bei der Ausführung der Bindungsphase unter starker Konzentration.

Steigende Verdünnungen (Volumen 0,1 ccm) des Tuberkuloseantigens, das verdampft und im ursprünglichen Volumen in physiologischer Kochsalzlösung wieder aufgenommen war, wurden mit je 0,1 ccm inaktivierten unverdünnten Patientenserums unter Zusatz von je 0,1 ccm 4fach verdünnten Meerschweinchenserums digeriert.

Zu den Reihen I wurden sofort je 1,2 ccm physiologischer Kochsalzlösung zugefügt, während zu den Reihen II dieser Zusatz von Kochsalzlösung erst nach 1½stündigem Brutschrankaufenthalt erfolgte. Ueberall wurde sodann je 1 ccm eines gleichteiligen Gemisches von Hammelblutaufschwemmung und Ambozeptorverdünnung zugefügt.

In einer Kontrollreihe a) wurde das Patientenserum durch Kochsalzlösung ersetzt, zu den Reihen b und c) dienten Sera von tuberkulös Erkrankten, die bei der Serodiagnostik der Tuberkulose stark bzw. schwach positiv reagiert hatten.

Das Ergebnis zeigt Tabelle IX.

Der Versuch zeigt, daß in der Tat bei starker Konzentration (Teil II der Tabelle) eine erhebliche Verstärkung der Komplementbindung eingetreten ist. Auch das nur schwach reagierende Tuberkuloseserum c reagiert unter den be-

1) E. Witebsky, R., Klingenstein und H. Kuhn, Klin. Wochenschr., 1931, S. 1068.

Tabelle IX.

| Verdünnungen des Tuberkuloseantigens | Hämolyse von Hammelblut durch Ambozeptor und Komplement nach dessen Vorbehandlung mit Tuberkuloseantigen (a) bzw. mit Tuberkuloseantigen + Patientenserum (b u. c) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | I schwach konzentriert | | | II stark konzentriert | | |
| | a NaCl | b Pat.-Ser. | c Pat.-Ser. | a NaCl | b Pat.-Ser. | c Pat.-Ser. |
| 1:1 | k | Sp | k | m | 0 | w |
| 1:3 | k | 0 | st | m | 0 | 0 |
| 1:9 | k | Sp | st | st | 0 | 0 |
| 1:27 | k | st | st | fk | 0 | 0 |
| 1:81 | k | fk | fk | k | w | 0 |
| 1:243 | k | k | k | k | fk | Sp |
| 1:729 | k | k | k | k | k | k |

günstigenden Bedingungen stark positiv. Dabei muß allerdings besonders auf die Eigenhemmung hingewiesen werden, die, wie Reihe IIa der Tabelle zeigt, beim einfachen Digerieren des Tuberkuloseantigens mit Meerschweinchenserum eingetreten ist. Immerhin ist aber die Verstärkung bei Zusatz der Patientensera so weitgehend, daß man wohl auch hier die beschriebene Wirkung der Volumverminderung anzunehmen berechtigt ist. Ob sich hieraus eine Verwendbarkeit des Vorganges für die praktische Serodiagnostik ergibt, muß freilich dahingestellt bleiben. Dazu wären ausgedehnte Vergleichsuntersuchungen in bezug auf die Spezifitätsfrage erforderlich.

Im Gegensatz zu den Erfahrungen über Komplementbindung mit Antisera, die gegen Eiweißantigene gerichtet sind, führten Versuche mit sogenannten Lipoidantisera zu negativen Ergebnissen. Ich habe neben heterogenetischen Antisera Lezithin(Merck)-Antisera sowie Rinderherzextrakt-Antisera herangezogen, ohne daß es mir möglich war, entsprechende Unterschiede in der Abhängigkeit von der Konzentration während der Bindungsphase festzustellen. Immerhin bestanden unter geeigneten Bedingungen Differenzen zugunsten der starken Konzentration. Sie waren aber gegenüber den bei Eiweißantisera beobachteten Unterschieden nur von einer unerheblichen Größenordnung. Auch bei der Wassermannschen Reaktion waren die Unterschiede in kleinem und großem Volumen während der Bindungszeit, wenn überhaupt vorhanden, so nur geringfügiger Art. Worauf das anders-

artige Verhalten der Eiweißantikörper und der Lipoidantikörper beruht, und ob es gesetzmäßiger Art ist, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

## Zusammenfassung.

1) Bei der Komplementbindung mit Eiweißantisera ergaben sich wesentliche Unterschiede der Wirkung, je nachdem die Komplementbindungsphase in geringem Volumen bei starker Konzentration oder in größerem Volumen bei schwacher Konzentration vor sich ging. Im ersteren Falle war der Komplementbindungseffekt sehr wesentlich verstärkt. Die Verstärkung äußerte sich besonders deutlich bei später Ablesung der Hämolyse, während sie bei frühzeitiger Ablesung nicht in dem gleichen Maße wahrnehmbar war. Die Komplementbindung weist also bei schwacher Konzentration zugleich eine geringere Stabilität auf als bei starker Konzentration.

2) Die Unterschiede kommen bei kurzer Bindungszeit auch bei frühzeitiger Ablesung stark zum Ausdruck.

3) Trotz der wesentlichen Verstärkung, die die Komplementbindung bei starker Konzentration erfährt, ist die Spezifität der Antikörperwirkung gewahrt.

4) Die Stärke des Komplementbindungseffekts nimmt fortschreitend mit der Vergrößerung des Volumens in der Bindungsphase ab.

5) Die genannten Unterschiede werden um so stärker, je geringere Antiserummengen benutzt werden.

6) Durch Kombination von starker Konzentration und Verminderung des Kochsalzgehaltes in der Bindungsphase wurde eine weitere Steigerung der Komplementbindung erreicht.

7) Auch mit antibakteriellen Immunsera konnten entsprechende Unterschiede der Wirkung, wenn auch nicht in gleichem Maße wie mit Eiweißantisera, nachgewiesen werden. Auch bei der Serodiagnostik der Tuberkulose mit Tuberkuloseantigen kann eine Verstärkung der Reaktionsfähigkeit erzielt werden.

8) Im Gegensatz zu dem Verhalten der Eiweißantisera wurde bei Verwendung von sogenannten Lipoidantisera wie auch unter den Bedingungen der Wassermannschen Reaktion eine Verstärkung der Komplementbindung durch Volumverminderung in der Bindungsphase nicht oder nur in verhältnismäßig geringem Grade erzielt.